

# 苦皮藤素 V 引起粘虫失水的作用机理初探<sup>\*</sup>

杨润亚<sup>1</sup>, 刘惠霞<sup>1</sup>, 吴文君<sup>1</sup>, 王金丽<sup>2</sup>

(1 西北农林科技大学 植物源农药研究与开发陕西省重点实验室, 陕西 杨陵 712100; 2 西安市 动物园, 陕西 西安 710032)

**[摘 要]** 对苦皮藤素 V 引起粘虫失水的作用机理进行了初步研究。结果表明: 中毒试虫经消化道流失的液体与对照试虫血淋巴中蛋白质含量无显著差异, 但比对照试虫肠液中蛋白质含量高 47.97%。认为, 试虫经消化道丧失的液体主要为昆虫的血淋巴; 试虫经苦皮藤素 V 处理后, 抽搐期中肠  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$  酶活性与对照无显著差异, 而失水期酶活性升高了 10.07%, 并且苦皮藤素 V 引起中毒试虫中肠环腺苷酸(cAMP)的含量显著升高。

**[关键词]** 植物性杀虫剂; 苦皮藤素 V; 作用机理

**[中图分类号]** S482.3<sup>+</sup>9

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1000-2782(2001)02-077-03

近年来天然产物的开发、研究和利用已成为农药研究的热点, 因为它既可发现新的先导化合物, 创制新型农药; 也可研究作用机理提供素材, 发现新的靶标, 进行生物合理设计。对于创制新型农药, 丰富昆虫生理、毒理学理论等有深远的意义。全世界曾经或正在广泛使用的杀虫剂, 绝大多数是神经毒剂。昆虫的消化系统是昆虫对食物进行消化、吸收的主要场所。对消化系统的破坏, 必将导致昆虫营养不良、生长发育受阻乃至死亡。因此, 昆虫的消化系统应是杀虫剂的重要作用靶标, 研究和开发以昆虫消化系统为靶标的杀虫剂应是可行的、颇具潜力的。

苦皮藤素 V 是一种具有杀虫活性的天然产物, 试虫取食后, 产生类似于霍乱毒素感染人畜后引起的失水症状。已有的研究表明<sup>[1]</sup>, 苦皮藤素 V 作用于昆虫的消化系统, 破坏中肠肠壁细胞质膜及内膜系统, 体液穿过肠壁细胞进入消化道, 引起昆虫呕吐、泻泄, 失水而死。但对其引起昆虫失水的作用机理未曾研究。本研究参考霍乱毒素的作用机理, 初步探讨了苦皮藤素 V 引起试虫失水的作用机理, 旨在为生物合理设计创制新型杀虫剂提供依据。

## 1 材料和方法

**试 虫** 粘虫(*Mythimna separata*): 室内人工饲养。挑选蜕皮后饥饿 16 h 的 6 龄幼虫供试。

**药 剂** 苦皮藤素 V: 纯度为 90% 以上, 使用时配成质量浓度 10 g/L 的丙酮溶液。

**试验方法** 试虫采用载毒叶碟饲喂法<sup>[2]</sup>处理。

试验设对照(试虫不给药)、试虫抽搐期和失水期 3 个处理, 每处理重复 3~5 次。试虫肠道返吐液(失水期即失水液)和血淋巴蛋白质含量采用 Folin-酚法<sup>[3]</sup>测定; 中肠  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$  酶活性的测定参照冯北远<sup>[4]</sup>的方法; 中肠 cAMP 含量测定借助同位素技术, 采用蛋白质竞争结合法<sup>[5]</sup>, 样品制备采用沸水变性法<sup>[6]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 苦皮藤素 V 对试虫返吐液和血淋巴蛋白质含量的影响

量的影响用苦皮藤素 V 处理后, 各处理试虫肠道返吐液和血淋巴蛋白质含量测定结果(表 1)表明, 苦皮藤素 V 作用于粘虫后, 在失水期试虫肠道返吐液(即失水液)蛋白质含量明显高于对照(比对照高 47.97%), 抽搐期和对照试虫肠道返吐液的蛋白质含量没有显著差异; 苦皮藤素 V 对试虫血淋巴蛋白质含量无显著影响, 失水期试虫失水液的蛋白质含量和对照试虫血淋巴的蛋白含量无显著差异。表明中毒试虫失水期的失水液实际上为试虫的血淋巴。

### 2.2 苦皮藤素 V 对试虫中肠 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活性的影响

经苦皮藤素 V 处理后失水期试虫中肠  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$  的酶活性高于对照试虫 10.07%, 而抽搐期试虫的酶活性和对照无显著差异(表 2)。说明苦皮藤素 V 并不抑制失水期试虫的酶活性, 即不影响细胞膜对钠离子的主动运输。

\* [收稿日期] 2000-04-03

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(29522003)

[作者简介] 杨润亚(1974-), 女, 陕西蒲城人, 在读博士生, 主要从事农药毒理学研究。

表 1 苦皮藤素 V 对试虫肠道返吐液和血淋巴蛋白质含量的影响

处理 Treatment	肠道返吐液 Regurgitation juice			血淋巴 Haemolymph		
	蛋白质含量/ (g · L <sup>-1</sup> ) The protein level	差异显著性 The significance of difference		蛋白质含量/ (g · L <sup>-1</sup> ) The protein level	差异显著性 The significance of difference	
		Q 05	Q 01		Q 05	Q 01
失水期 The period of losing the body fluid	18.0 ± 0.18	a	A	22.1 ± 1.09	a	A
对 照 Control	12.3 ± 0.43	b	B	20.8 ± 0.88	ab	A
抽搐期 The period of convulsion	11.6 ± 2.25	b	B	19.3 ± 1.02	b	A

注:表中数据为 5 次的平均值 ± 标准误,蛋白质回归方程为  $y = 0.0166 + 0.9171x$  ( $r = 0.9995$ )。  
Note: Data are given as means ± standard errors from five replications, the regression equation of protein is:  $y = 0.0166 + 0.9171x$  ( $r = 0.9995$ ).

表 2 苦皮藤素 V 对试虫中肠 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶活性的影响

处理 Treatment	酶活/(nmol · mg <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> ) The activity of Na <sup>+</sup> / K <sup>+</sup> -ATPase	差异显著性 The significance of difference	
		Q 05	Q 01
失水期 The period of losing the body fluid	14.76 ± 0.66	a	A
对 照 Control	13.41 ± 0.80	b	B
抽搐期 The period of convulsion	12.45 ± 0.82	b	B

注:表中数据为 4 次的平均值 ± 标准误,回归方程:  $y = 0.361 + 50.9x$  ( $r = 0.9998$ )。  
Note: Data are given as means ± standard errors from four replications, the regression equation is:  $y = 0.361 + 50.9x$  ( $r = 0.9998$ ).

2.3 苦皮藤素 V 对试虫中肠 cAMP 含量的影响  
苦皮藤素 V 对中毒试虫中肠 cAMP 含量的影响结果(表 3)表明,抽搐期和失水期试虫中肠 cAMP 含量明显高于对照试虫,且抽搐期试虫中肠 cAMP 含量也高于失水期试虫。说明苦皮藤素 V 可能通过 cAMP 的作用而使中毒试虫产生失水。

表 3 苦皮藤素 V 对中毒试虫中肠 cAMP 含量的影响

处理 Treatment	放射性强度/Bq Radiation intensity	差异显著性 The significance of difference	
		Q 05	Q 01
对 照 Control	8.4 ± 0.21	a	A
失水期 The period of losin the body fluid	6.7 ± 0.25	b	B
抽搐期 The period of convulsion	5.9 ± 0.13	c	C

注:表中的数据为 3 次的平均值 ± 标准误,放射性强度越大表明组织中 cAMP 含量越小。  
Note: Data are given as means ± standard errors from three replications, the higher of the value of radiation intensity, the lower of the content of cAMP in midgut cell

3 讨 论

试虫取食苦皮藤素 V 后,可产生类似于霍乱毒素感染人畜后引起的失水症状。霍乱毒素是一种对人畜有致命作用的毒素,它能引起人畜大量体液从消化道丧失而导致死亡,已有研究报道其作用机理是由于肠道粘膜细胞的腺苷酸环化酶(AC)被活化,

cAMP 含量增加,cAMP 使 Na<sup>+</sup> 从肠壁细胞向血液的主动运输受阻,从而使 Cl<sup>-</sup> 从肠壁细胞向肠腔移动,同时伴随 Na<sup>+</sup> 吸收而进入血液的水和盐分也转而向肠腔内分泌<sup>[7~9]</sup>,分泌过程的亢进导致了剧烈的腹泻和呕吐,因而引起体液的大量流失。但感染霍乱毒素的人畜,其肠道细胞的细胞膜仍保持完整,并不出现“孔洞”,且患者丧失的体液和正常情况下肠

道内的液体组分几乎相同, 其蛋白质含量并未明显升高<sup>[8]</sup>, 引起患者死亡的原因是由于大量脱水。

测定苦皮藤素V对中毒试虫中肠 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP酶活性和cAMP含量的影响结果表明, 苦皮藤素V引起cAMP含量的升高, 但并不抑制 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP酶的活性, 即不影响 $\text{Na}^+$ 的主动运输。苦皮藤素V可造成失水期中中毒试虫中肠肠壁细胞膜的穿孔。测定苦皮藤素V对试虫肠道返吐液和血淋巴蛋白质含量的影响, 表明中毒试虫的失水液实际为昆虫的血淋巴。另外, 试验过程中还发现, 失

水期试虫的失水液刚开始为淡黄色(血淋巴颜色), 在空气中放置一段时间后颜色变成黑色(血淋巴在空气中经酪氨酸酶催化形成暗色产物<sup>[10]</sup>), 而对照试虫肠道返吐液中不会发生这种现象, 这个现象从另一个侧面说明了苦皮藤素V作用于粘虫后导致试虫中肠肠壁细胞膜穿孔而使血淋巴经消化道丧失, 引起试虫死亡的原因是失血过多。以上结果说明苦皮藤素V的作用机理不同于霍乱毒素, 但其引起的cAMP含量升高的作用和意义尚不清楚。苦皮藤素V引起昆虫失水的作用机理还需进一步研究。

### [参考文献]

- [1] 刘惠霞, 董育新, 吴文君. 苦皮藤素V对东方粘虫中肠细胞及其消化酶活性的影响[J]. 昆虫学报, 1998, 41(3): 261- 264
- [2] 吴文君. 植物化学保护实验技术导论[M]. 西安: 陕西科技出版社, 1988
- [3] 南京农业大学. 昆虫生理生化实验[M]. 北京: 农业出版社, 1993
- [4] 冯北远. 大鼠脑突触体 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP酶活力的微量测定方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1981, (2): 48- 49
- [5] 陈海鑫. 组织中cAMP、cGMP放免分析法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 1986, (5): 78
- [6] 《放射免疫分析及其他放射体外测定方法》编辑组. 放射免疫分析及其他放射体外测定方法[M]. 北京: 原子能出版社, 1975
- [7] 野智羲则, 香山靖雄. 生物膜与疾病[M]. 杨畔农译. 北京: 人民卫生出版社, 1985
- [8] 刘惠霞, 李新岗, 吴文君. 昆虫生物化学[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1998
- [9] Nohr H, William B. Greenough III. Cholera[J]. Scientific American, 1971, 225(2): 15- 21.
- [10] P. 卡尔森. 病理生化学[M]. 张增明译. 北京: 科学出版社, 1984
- [11] 张继红, 王琛柱, 钦俊德. 苏云金芽孢杆菌 $\delta$ 内毒素的杀虫机理及其增效途径[J]. 昆虫学报, 1998, 41(3): 323- 332

## Study on the functioning mechanism of celangulin V

YANG Run-ya<sup>1</sup>, LIU Hui-xia<sup>1</sup>, WU Wen-jun<sup>1</sup>, WANG Jin-li<sup>2</sup>

(1 Laboratory of Phytoresource Pesticide R. & D., Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Xi'an Zoo, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

**Abstract:** The primary study on the functioning mechanism of Celangulin V causing the loss of the body fluid has been conducted by the biochemical methods and isotopic technique. The results show that, after the sixth-instar larvae of *Mythimna separata* following oral administration with Celangulin V, on the period of losing the body fluid, compared with untreated larvae, the protein level of the regurgitation juice in the treated larvae (i.e. the lost fluid) increased by 47.97%; no remarkable difference of the protein level was observed not only between the haemolymph of the treated larvae and the untreated larvae, but also between the lost fluid of the treated larvae and the haemolymph of the untreated larvae. It can be assumed that the lost fluid is the haemolymph of the larvae. On the period of convulsion, the activity of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase has no significant difference between the treated larvae and the untreated larvae, but on the period of losing body fluid, the activity of the enzyme in the treated larvae is slightly increased (10.07%) compared with untreated larvae. The content of cAMP in midgut cell of the treated larvae is raised compared with untreated larvae.

**Key words:** botanical insecticide; Celangulin V; functioning mechanism